昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2002，45（3）：285－289 ISSN 0454-6296

棉铃虫普通气味结合蛋白Ⅱ基因的表达及鉴定

王桂荣，郭予元，吴孔明*
（中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100094）

摘要：通过 PCR 扩增的方法获得了棉铃虫普通气味结合蛋白Ⅱ（GOBP2-Harm）基因成熟蛋白阅读框序列，构建了 GOBP2-Harm 原核表达载体 pGEX/GOBP2-Harm，并成功地在大肠杆菌中进行了表达。SDS-PAGE 分析表明：大部分 GOBP2-Harm 重组蛋白形成不溶性的包涵体，超声波破碎大肠杆菌细胞后，在上清液中能检测到少量的可溶性 GOBP2-Harm 蛋白。为了获得大量纯化的可溶性目的蛋白，我们对包涵体进行了溶解和重折叠，并通过亲合层析法进行了纯化。纯化产物能与多音天蚕（*Antheraea polyphemus*）GOBP 抗血清发生交叉反应，证实表达产物属于昆虫普通气味结合蛋白。

关键词：棉铃虫；普通气味结合蛋白Ⅱ；PCR 扩增；原核表达；重组蛋白；亲合层析
中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）03-0285-05

Expression and identification of general odorant binding protein Ⅱ from *Helicoverpa armigera*（Hübner）

WANG Gui-Rong，GUO Yu-Yuan，WU Kong-Ming*（State Key Laboratory of Plant Diseases and Insect Pests，Institute of Plant Protection，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Beijing 100094，China）

Abstract: The intact open-reading fragment sequence of mature GOBP2-Harm from *Helicoverpa armigera* was obtained by PCR amplification. The ORF of GOBP2-Harm was subcloned into expression vector pGEX-4T-1. Recombinant protein was expressed successfully in *E. coli* induced by IPTG. The analysis of SDS-PAGE showed that most of recombinant protein was insoluble inclusion body and only little fraction of recombinant protein of GOBP2-Harm is soluble. In order to obtain abundant soluble recombinant protein，the insoluble inclusion body GOBP2-Harm was solubilized，refolded and purified. The purified product was crossreactive with an anti-GOBP（*Antheraea polyphemus*）antiserum，which indicated the purified protein belonged to GOBP of insect.

Key words: *Helicoverpa armigera*；general odorant binding protein Ⅱ；PCR amplification；prokaryotic expression；recombinant protein；affinity chromatography

昆虫气味结合蛋白（odorant binding protein，OBP）是一类小分子量的酸性蛋白，序列中有 6 个保守的半胱氨酸位点和相似的二级结构（Pelosi and Maida，1995；Krieger *et al*.，1996）。气味结合蛋白与气味分子发生结合是昆虫嗅觉识别的第一步生化反应，在昆虫寻觅配偶、寻找食物和生殖场所的过程中起着重要的作用（Steinbretch，1996，1998；Li and Prestwich，1997）。根据识别的气味分子不同，气味结合蛋白分为两大类：一类是性信息素结合蛋白（pheromone binding protein，PBP），它主要存在于雄蛾触角中，与昆虫感受性信息素有关（Vogt and Riddiford，1981；Steinbretch *et al*.，1992；Steinbretch，1998）；另一类是普通气味结合蛋白（general odorant binding protein，GOBP，包括 GOBP1 和 GOBP2），在雌、雄蛾触角中均存在，并且表达量相同，至少有试验证明 GOBP2 在昆虫感受普通气味物质（如寄主植物或天敌、猎物发出的气味）过程中起着重要作用（Breer，1990；Vogt *et al*.，1991；Steinbretch *et al*.，1995；Li and Prestwich，1997；Steinbretch，1998）。由于昆虫触角较小，从中分离纯化蛋白及研究其生化特性和生理功能比较困难（Vogt and Riddiford，1981；Nagnan-Le *et al*.，1996；Vogt *et al*.，1999），因此，目前对于昆虫 OBP 的功能主要是根据生理和生化资料作出的合理

基金项目：国家重点基础研究发展规划项目（G2000016208）和植物病虫害生物学国家重点实验室开放课题资助
第一作者简介：王桂荣，男，1972 年 12 月生，博士，主要从事昆虫生物化学和分子生物学研究，E-mail：wgrsun@163.com
* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：wkm@caascose.net.cn
收稿日期 Received：2001-09-03；接受日期 Accepted：2002-01-15

推测，还需要在更多的昆虫中进行验证。近年来，随着分子生物学技术的发展，利用基因克隆和表达的方法获得大量的昆虫气味结合蛋白成为可能（Krieger *et al*.，1992；Prestwich，1993；Li and Prestwich，1997；Maibeche-Coisne *et al*.，1998），这为进一步研究昆虫气味结合蛋白的生化特性和生理功能提供了很好的思路与途径。

本实验通过PCR的方法获得了棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 触角普通气味结合蛋白Ⅱ（GOBP2-Harm）基因成熟蛋白的阅读框架，构建了该基因的原核表达载体，转化大肠杆菌后进行了诱导表达，通过这种方法可以获得大量的气味结合蛋白，从而解决棉铃虫触角小、气味结合蛋白难于提取和纯化的问题。

1 材料与方法

1.1 材料

棉铃虫为本实验室用人工饲料单管饲养，羽化后3天内剪下触角，立即放在液氮中冷冻，然后置-70℃冰箱保存备用。大肠杆菌宿主菌DH5α由中国农业科学院植物保护研究所国家重点实验室生物技术组提供；大肠杆菌BL21（DE3）、化学诱导型原核表达载体pGEX-4T-1由北京大学李斌博士提供。

1.2 试剂

限制性内切酶 *Eco*RⅠ为GIBCO BRL公司产品，NBT/BCIP购自Promega公司，蛋白分子量标准购自北京经科公司（Pharmacia产品），硝酸纤维素膜购自鼎国生物工程公司（Pall Corporation产品，BioTrace™NT，0.45 μm），多音天蚕 *Antheraea polyphemus* GOBP抗血清由本所麦虫组陈巨莲博士提供，IPTG、X-gal和氨苄青霉素购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 触角总RNA的提取及cDNA合成：取适量棉铃虫触角放入研钵中，加液氮磨成粉末，然后按照Sambrook等（1989）提出的盐酸胍和有机溶剂的方法提取总RNA。

cDNA合成试剂盒购自Promega公司，按照Kit说明进行操作。即取1 μg触角总RNA，加入1 μL Olig（dT)$_{18}$（50 μmol/L）和适量DEPC处理的水，置70℃温浴5 min后，迅速置冰上冷却2 min，再加入5 μL dNTP（10 mmol/L）、0.75 μL RNase抑制剂（40 U/μL）、5 μL 10×反转录酶buffer和1 μL反转录酶（200 U/μL），混匀后置42℃温浴1 h，94℃灭活5 min，以此作为PCR模板。

1.3.2 引物设计：根据本实验室克隆的棉铃虫GOBP2-Harm基因序列（已经在GenBank/EMBL中登记，序列号为AJ278991）设计并合成如下引物：

正向引物GOBP2s：

5′-gt***GGATCC***ACTGCCGAGGTGATGAGCCATG-3′

*Bam*HⅠ

反向引物GOBP2a：

3′-CGGCAGTACCTCTTCATGACT***CTTAAG***gt-5′

*Eco*RⅠ

为了便于将PCR产物亚克隆到表达载体上，在引物中设计了酶切位点（黑色斜体序列）。正向引物中有 *Bam*HⅠ切点，反向引物中有 *Eco*RⅠ切点。

1.3.3 PCR扩增：反应混合液包括cDNA 2 μL、10×PCR缓冲液5 μL、正向和反向引物各1 μL（10 μmol/L），10 mmol/L dNTP 1 μL，20 mmol/L $MgCl_2$ 5 μL，Taq plus DNA聚合酶0.5 μL（2 U/μL），加水至50 μL，混匀，离心。然后在液面上加2滴石蜡油，反应在GeneAmp 480热循环仪（Perkin Elmer Cetus，Norwalk，CT）上进行。反应条件为：94℃变性3 min；接着进行30个循环，循环条件为94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 2 min；然后72℃保温10 min。扩增完毕后，用1%琼脂糖凝胶电泳检查，回收目的片段。

1.3.4 GOBP2-Harm融合表达载体的构建：PCR产物经乙醇沉淀后，用适量的双蒸水溶解，然后用 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切。电泳回收、纯化目的片段后，与经同样酶切的pGEX-4T-1融合表达载体连接并转化大肠杆菌DH5α，挑取多个菌落进行培养，提取少量质粒（质粒提取参照Sambrook等的方法），用酶切和PCR扩增两种方法鉴定阳性克隆。

1.3.5 序列测定：挑选经初步鉴定了的阳性克隆，接种到含有氨苄青霉素（200 μg/mL）的LB培养液振荡过夜，碱法提取质粒，采用ABI377全自动测序仪测序。

1.3.6 细胞培养和诱导表达：提取经鉴定的质粒pGEX/GOBP2-Harm，转化大肠杆菌BL21（DE3）感受态细胞，挑取单菌落接种于5 mL液体LB培养基中（含200 μg/mL氨卞青霉素）振荡培养过夜（37℃）。然后按1/100的比例转接于新鲜的液体LB培养基（含200 μg/mL氨卞青霉素）中，37℃振荡

培养 2.5 h，加入 IPTG（终浓度为 0.8 mmol/L），37℃振荡培养，进行诱导表达 8～12 h。

1.3.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析：吸取 1 mL 菌液，离心沉淀菌体，用 500 μL PBS 重新溶解沉淀，超声波彻底破碎菌体。离心后分别取上清和包涵体进行 SDS-PAGE 电泳检测。浓缩胶浓度为 5%，分离胶浓度为 12%。

1.3.8 重组蛋白的重折叠和纯化：按照 1.3.6 的方法大量地诱导表达重组蛋白（总体积为 1 L），7 000×g 离心沉淀细胞，细胞沉淀用溶液Ⅰ（80 mmol/L Tris-HCl，200 mmol/L NaCl，1 mmol/L EDTA，4% glycerol，pH 7.2，1 mmol/L PMSF）重新溶解，接着用超声波破碎细胞（10 s，5 passes），然后 5 000×g 离心沉淀包涵体，不溶性的包涵体用溶液Ⅱ（0.2% Triton X-100，50 mmol/L Tris-HCl，pH 6.8）洗 1 次，然后溶解在 10 mL 6 mol/L 盐酸胍中，根据 Li 和 Prestwich（1997）的方法进行重折叠。最后用 Glutathione Sepharose 4B 亲合层析柱对可溶性和重折叠的重组蛋白进行纯化。纯化产物用 SDS-PAGE 电泳进行分析，并用 Western 杂交进行检测。

1.3.9 Western blot 分析：参照 Sambrook 等（1989）的方法稍作修改进行 Western 杂交。具体操作如下：首先用封闭液（PBST＋5%的脱脂奶粉）封闭 2 h；接着与一抗（用 PBST 按 1∶2 500 的比例稀释）室温反应 1 h，用 PBST 洗膜 3 次；然后加入 PBST 稀释的羊抗兔 IgG-AP（1∶500），室温反应 1 h，用 PBST 洗膜 3 次；最后将 NC 膜置于含有 NBT 和 BCIP 的显色液中显色至条带清晰，将膜放入蒸馏水中漂洗终止显色反应。取出晾干，拍照。

2 结果与分析

2.1 GOBP2-Harm 原核表达载体的构建

以 GOBP2s 和 GOBP2a 为引物，棉铃虫雌蛾触角 cDNA 为模板，PCR 扩增得到了一条约 430 bp 的特异性条带（图 1）。PCR 产物用酚/氯仿抽提，乙醇沉淀，接着经 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ双酶切，回收纯化目的片段，然后与经同样酶切处理的 pGEX-4T-1 载体连接（图 2）。连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞，从平板上随机挑选 6 个克隆在 LB 培养基中进行培养，提取质粒，经 PCR 和酶切进行鉴定表明 6 个克隆中的插入子大小都正确。随机选取一个克隆，提取质粒后转化大肠杆菌 BL21（DE3），挑取一个克隆在 LB 培养基中进行培养，接着提取质粒进行测序，结果表明载体与插入片段连接区编码框架是正确的。

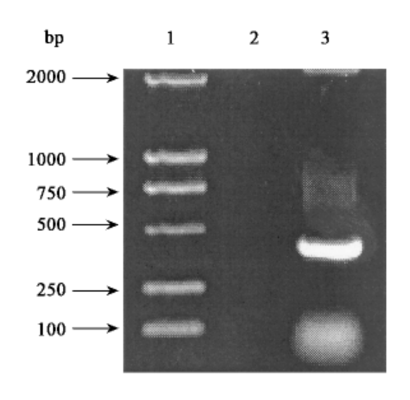


图 1 GOBP2-Harm 基因 PCR 扩增产物电泳分析

Fig. 1 Analysis of PCR product for GOBP2-Harm in a 1% agarose gel

1. 标准分子量 molecular weight marker（DL2000）；
2. 蒸馏水代替 cDNA 作为模板 no template；
3. cDNA 作为模板 cDNA as template

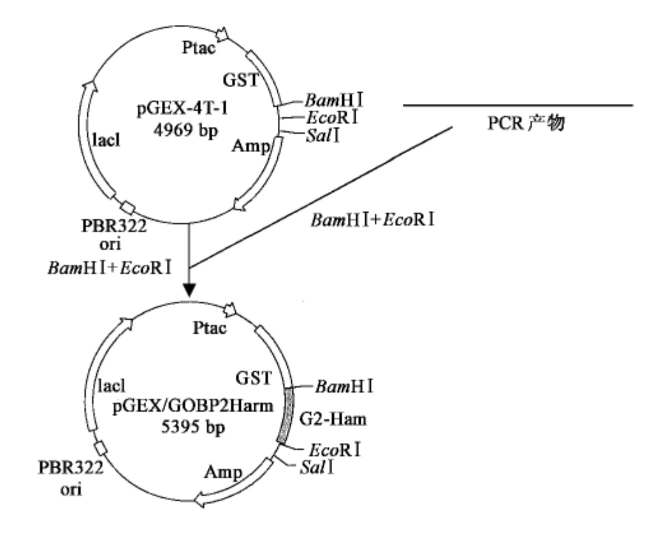


图 2 GOBP2-Harm 基因原核表达载体的构建

Fig. 2 Construction of prokaryotic expression vector for GOBP2-Harm

2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

将鉴定了的、含有重组子 pGEX/GOBP2-Harm 的菌株 BL21（DE3）用 IPTG（终浓度为 0.8 mmol/L）进行诱导表达。表达产物经 SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝 R-250 染色，结果表明：含有重组子 pGEX/GOBP2-Harm 的菌体 BL21（DE3）经 IPTG 诱导后，特异性地产生 41 kD 条带，大部分重组蛋白形成包涵体，只有少量的可溶性蛋白（图 3）。并且表达的特异性蛋白比目的蛋白的分子量大，这是因为 pGEX-4T-1 是一个融合表达载体，重组子在大

肠杆菌中表达时，目的蛋白的 N-端连上了一段谷胱甘肽转移酶，分子量大约为 26 kD，这段序列的存在有利于进行诱导表达，同时便于利用亲合层析进行蛋白的纯化。

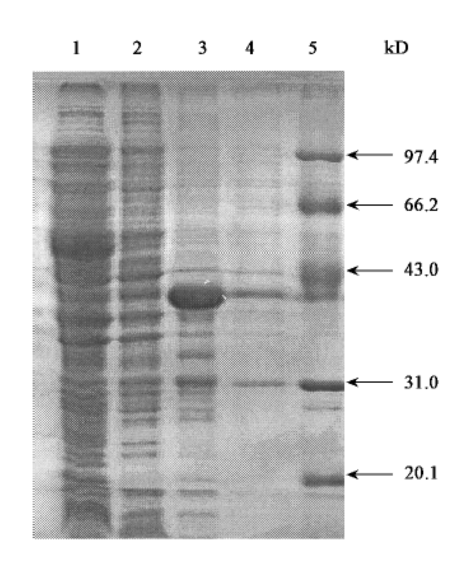


图 3 pGEX/GOBP2-Harm 表达产物电泳分析

Fig. 3 Electrophoresis of expressed product for pGEX/GOBP2-Harm

1. 空菌体细胞沉淀 no-transformed cells pellet; 2. 未经诱导的 rGOBP2 细胞沉淀 non-induced rGOBP2 cell pellet; 3. 诱导的 rGOBP2 不溶性的包涵体 insoluble inclusion body of induced rGOBP2; 4. 诱导的 rGOBP2 细胞裂解上清液 induced rGOBP2 lysate supernatant; 5. 低分子量标准蛋白 low molecular mass protein markers (Pharmacia)

2.3 重组蛋白的重折叠和纯化

利用盐酸胍溶解包涵体，然后对溶解的包涵体进行了重新折叠，但是包涵体重折叠的效率并不是很高。因此，我们大量培养重组子并进行了诱导表达，重新折叠后再利用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱对重新折叠的重组蛋白进行纯化，纯化后的蛋白 PAGE 电泳后呈现一条特异性条带，Western 杂交表明纯化后的蛋白是我们所需的目的蛋白（图4）。

2.4 Western blot 分析

为了进一步检验表达、纯化后得到的蛋白是不是目的基因的表达产物，以多音天蚕的 GOBP-IgG 为第一抗体，碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 为第二抗体，对 pGEX/GOBP2-Harm 的大肠杆菌表达产物进行 Western blot 分析。结果表明，pGEX/GOBP2-Harm 经 IPTG 诱导产生的 41 kD 蛋白与多音天蚕的 GOBP 抗血清发生很强的交叉反应（图 5）。表明表达产物中的 41 kD 的蛋白条带含有目的基因表达产物。

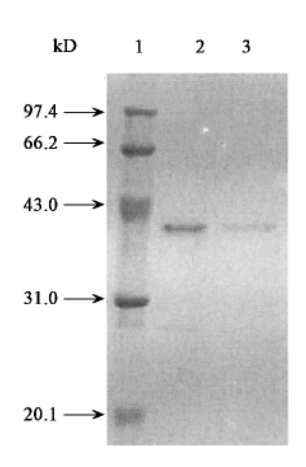


图 4 经亲和层析纯化的 GOBP2-Harm 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of primary purified GOBP2-Harm by in SDS-PAGE

1. 蛋白标准分子量 protein molecular weight marker; 2～3. 纯化的 rGOBP2-Harm purified rGOBP2-Harm



图 5 Western 杂交检测纯化的 rGOBP2

Fig. 5 Western blot of purified rGOBP2

3 讨论

自从利用同位素标记配体进行结合实验发现第一个昆虫气味结合蛋白以来，许多研究主要集中于寻找不同昆虫中新的 OBP，而对于其功能的研究相对较少，主要是由于昆虫触角较小，分离纯化 OBP 很困难，特别是同一种昆虫触角中通常存在几种 OBP，这些蛋白的结构和性质很相似，难以将它们完全分开。以往对昆虫 OBP 功能的研究主要是针对性质相似的一类 OBP，因此目前对于各种 OBP 的生理功能仍不很清楚，近年来利用基因表达的方法使这方面的研究成为可能。

我们根据本实验室克隆的棉铃虫 GOBP2-Harm 基因序列设计了一对引物，PCR 扩增获得了 GOBP2-Harm 基因完整的阅读框架序列，酶切后插入原核表达载体 pGEX-4T-1 上，构建了原核表达载体 pGEX/GOBP2-Harm。pGEX-4T-1 是化学型原核表达载体，其上依次具有 *Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ、*Sma*Ⅰ、*Sal*Ⅰ、*Xho*Ⅰ和 *Not*Ⅰ等 6 个内切酶插入位点。设计引物时，在正向引物和反向引物 5′端分别加入了 *Bam*HⅠ和 *Eco*RⅠ限制性内切酶位点，使

得 PCR 产物易于连接到载体上。另外在载体 pGEX-4T-1 上具有 Ptac 强启动子，能够使外源基因在大肠杆菌中进行高效表达。在启动子与多克隆位点之间有一段谷胱甘肽转移酶序列，这段序列的存在，既有利于外源基因的表达，又使重组蛋白易于通过亲合层析柱进行纯化。

经 SDS-PAGE 分离和 Western 杂交证实，构建的原核表达载体 pGEX/GOBP2-Harm 能够在大肠杆菌中高效表达出重组 GOBP2-Harm 蛋白。同时也表明大部分重组蛋白位于不溶性的包涵体中，超声波破碎大肠杆菌细胞后，在上清液中只能检测到少量的可溶性 GOBP2-Harm 蛋白。为了获得大量的 rGOBP2，我们对表达产物中的包涵体部分进行了重新折叠和纯化，获得了大量的 rGOBP2 蛋白。这一研究解决了因棉铃虫触角小，气味结合蛋白难于提取的问题，为研究棉铃虫触角气味结合蛋白的生化特性和生理功能，进而阐明棉铃虫嗅觉识别的分子机制打下了基础。

pGEX-4T-1 是一个化学诱导型表达载体，随后的研究发现，表达产物能否溶解受温度和 IPTG 的浓度影响较大，当 IPTG 浓度较低（0.1～0.4 mmol/L），同时降低温度时（25～28℃），表达产物中包涵体减少，可溶性蛋白增加。另外，在 PCR 产物和载体 pGEX-4T-1 连接后，首先转化的是大肠杆菌 DH5α，对重组子进行鉴定后，再提取质粒转化大肠杆菌 BL21（DE3），进行诱导表达，主要是考虑到大肠杆菌 BL21（DE3）感受态细胞转化效率低，利用质粒进行转化以提高转化效率。

参 考 文 献（References）

Breer H，1990. A novel class of binding proteins in the antennae of the silk moth *Antheraea pernyi*. *Insect Biochemistry*，20（7）：735－740.

Du G，Ng C S，Prestwich G D，1994. Odorant binding by a pheromone binding protein: active site mapping by photoaffinity labeling. *Biochemistry*，33：4 812－4 819.

Krieger J，Nickisch-Rosenegk E von，Mameli M，Pelosi P，Breer H，1996. Binding proteins from the antennae of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，26：297－307.

Krieger J，Raming K，Prestwich G D，Frith D，Stabel S，Breer H，1992. Expression of a pheromone-binding protein in insect cells using a baculovirus vector. *Eur. J. Biochem.*，203：161－166.

Li F，Prestwich G D，1997. Expression and characterization of a lepidopteran general odorant binding protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，27（5）：405－412.

Maibeche-Coisne M，Sobrio F，Delaunay T，Lettere M，Dubroca J，Jacquin-joly E，Nagnan-Le Meillour P，1997. Pheromone binding proteins of the moth *Mamestra brassicae*: specificity of ligand binding. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，27（3）：213－221.

Maibeche-Coisne M，Longhi S，Jacquin-joly E，Brunel C，Egloff M P，Gastinel L，Cambillau C，Tegoni M，Nagnan-Le Meillour P，1998. Molecular cloning and bacterial expression of a general odorant-binding protein from the cabbage armworm *Mamestra brassicae*. *Eur. J. Biochem.*，258：768－774.

Nagnan-Le Meillour P，Huet J C，Maibeche M，Pernollet J C，Descoins C，1996. Purification and characterization of multiple forms of odorant/pheromone binding proteins in the antennae of *Mamestra brassicae*（Noctuidae）. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，26（1）：59－67.

Pelosi P，Maida R，1995. Odorant-binding proteins in insects. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*，111（3）：503－514.

Prestwich G D，1993. Bacterical expression and photoaffinity labeling of pheromone binding protein. *Protein Science*，420－428.

Sambrook K J，Fritsch E F，Maniatis T，1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Steinbrecht R A，Laue M，Ziegelberger G，1995. Immunocytochemical of pheromone-binding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moth *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res.*，282：203－217.

Steinbrecht R A，Ozaki M，Ziegelberger G，1992. Immunocytochemical localization of pheromone-binding protein in moth antennae. *Cell Tissue Res.*，270：287－302.

Steinbrecht R A，1996. Are odorant-binding proteins involved in odorant discrimination? *Chem. Senses*，21（6）：719－727.

Steinbrecht R A，1998. Odorant-binding proteins: expression and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*，855：323－332.

Vogt R G，Riddiford L M，1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*，293，161－163.

Vogt R G，Callahan F E，Rogers M E，Dickens J C，1999. Odorant binding protein diversity and distribution among the insect orders，as indicated by LAP，an OBP-related protein of the true bug *Lygus lineolaris*（Hemiptera，Heteroptera）. *Chem. Senses*，24（5）：481－495.

Vogt R G，Rybczynski R，Lerner M R，1991. Molecular cloning and sequencing of general-odorant binding proteins GOBP1 and GOBP2 from the tobacco hawk moth *Manduca sexta*: comparisons with other insect OBPs and their signal peptides. *Journal of Neuroscience*，11：2 972－2 984.